

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

2 265 402

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 74 11478

(54) **Protéines et peptides ayant une activité tuberculique et leur procédé de préparation.**

(51) Classification internationale (Int. Cl.²). **A 61 K 37/002; C 07 C 103/052; C 07 G 7/00.**

(22) Date de dépôt 29 mars 1974, à 16 h 37 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 43 du 24-10-1975.

(71) Déposant : Société dite : MITSUI PHARMACEUTICALS, INCORPORATED, résidant
au Japon.

(72) Invention de :

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, 75441 Paris Cedex 09.

La présente invention est relative à des protéines et peptides simples ayant une activité tuberculinique, possédant comme groupe fonctionnel actif l'enchaînement peptidique -Asn-Gly-Ser-Gln-Met- dans lequel Asn et Gln représentent un résidu d'asparagine et un
5 résidu de glutamine, respectivement, et les autres abréviations ont leurs significations connues habituelles.

Il est bien connu que les dérivés protéiniques purifiés (DPP) provenant de tuberculine vieillie (TV) extracellulaire ont servi exclusivement jusqu'à présent au diagnostic de la tuberculose. Malheu-
10 reusement, en plus de la protéine tuberculinique, les DPP contiennent d'autres protéines inactives, des acides nucléiques, des polysaccharides et des acides gras. Etant donné que les protéines de la tuberculose n'ont pas été obtenues à l'état pur, leurs propriétés physico-chimiques, les séquences de leurs acides aminés et leurs
15 propriétés biologiques n'ont pas été déterminées.

La Demanderesse a réussi à isoler des protéines simples à activité tuberculinique à partir de corps bacillaires de bacilles tuberculeux et les ont obtenues sous des formes cristallines. Les séquences d'acides aminés et la composition des acides aminés par molécule
20 des protéines obtenues ont pu ainsi être déterminées. En outre, les peptides à activité tuberculinique ont été obtenus par hydrolyse des protéines obtenues ci-dessus. Les résultats des recherches ont montré que l'activité tuberculinique est étroitement liée au groupe fonctionnel précité existant au sein des protéines et des peptides.

25 Les protéines simples à activité tuberculinique selon l'invention sont préparées à partir de corps bacillaires de bacilles tuberculeux, par traitement des corps bacillaires avec des solvants organiques, digestion des matières résultantes avec des nucléases, dialyse des protéines hydrosolubles obtenues et fractionnement des dialysats résultants par chromatographie et/ou filtration sur gel.

Les bacilles tuberculeux utilisés dans l'invention sont obtenus à partir de souches de Mycobacterium tuberculosis de type humain ou bovin, comprenant le BCG (Bacille de Calmette et Guérin) et d'autres. Les protéines à activité tuberculinique que l'on peut obtenir dépen-
35 des bacilles tuberculeux et des conditions de préparation utilisées dans le procédé de l'invention. Par exemple, la protéine à activité tuberculinique extraite de la souche Aoyama B de Mycobacterium tuberculosis de type humain est composée de 89 résidus d'acides ami-

nés par molécule. D'autre part, la protéine active provenant du BCG est composée de 135 résidus d'acides aminés par molécule.

Les bacilles tuberculeux sont traités avec des solvants organiques tels que des cétones, des alcools, des acides carboxyliques, etc.. Il est préférable d'utiliser l'acétone, le méthanol ou l'acide acétique. Il est bien entendu que ces solvants peuvent être utilisés avec de l'eau. Les matières traitées au solvant sont mises à digérer avec des nucléases telles que les ribonucléases, les désoxyribonucléases, etc.. Les protéines hydrosolubles sont séparées des mélanges obtenus et sont dialysées contre des tampons à pH 5,5 - 7,8 comme le tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane-acide chlorhydrique, à pH 7,0 contenant de l'acide éthylènediamine tétracétique, ou un tampon phosphate disodique-phosphate monopotassique à pH 7,2 contenant de l'acide éthylènediamine tétracétique, etc..

Les protéines à activité tuberculinique dialysées sont fractionnées par chromatographie et/ou filtration sur gel. On utilise de préférence une chromatographie sur colonne utilisant une cellulose échangeuse d'ions ou une filtration sur gel utilisant un polymère de dextrane réticulé. Les celluloses échangeuses d'ions qui peuvent être utilisées pour le fractionnement des dialysats précités sont, par exemple, l'aminoéthyl(AE)cellulose, la diéthylaminoéthyl(DEAE)-cellulose, la triéthylaminoéthyl(TEAE)-cellulose ou l'épichlorhydrine-triéthanolamine(ECTEOLA)-cellulose. Les polymères de dextrane réticulé utilisables pour fractionner les dialysats précités sont, par exemple, les Sephadex (marque déposée par Pharmacia Co.) de la série G (G-20 ~ G-200) ou les Séphadex échangeurs d'ions tels que les carboxyméthyl(CM)-Sephadex, sulfoéthyl(SE)-Sephadex, etc.. Les protéines dialysées sont éluées avec les tampons précités.

Les protéines simples à activité tuberculinique suivant la présente invention sont solubles dans l'eau et leurs poids moléculaires, compris entre 5000 et 25.000, dépendent des bacilles tuberculeux utilisés pour leur préparation ainsi que des conditions opératoires utilisées pour leur préparation. Les tests tuberculiniques cutanés indiquent que les protéines simples à activité tuberculinique suivant la présente invention sont de 10 à 100 fois plus puissantes que les DPP sur cobayes sensibilisés par Mycobacterium tuberculosis, souche Aoyama ou de type BCG tuée par la chaleur.

On prépare les peptides à activité tuberculinique suivant la

présente invention en hydrolysant les protéines tuberculiques précitées et on les obtient en fractionnant leurs hydrolysats par chromatographie et/ou filtration sur gel. Les protéines à activité tuberculique peuvent être hydrolysées par voie chimique ou enzymatique.

- 5 On effectue l'hydrolyse chimique à l'aide d'un acide minéral.
On effectue l'hydrolyse enzymatique à l'aide d'une enzyme protéolytique telle que la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine, la papaïne, les protéinases bactériennes, la carboxypeptidase A ou B, etc.. Les hydrolysats obtenus sont fractionnés par chromatographie sur colonne,
10 chromatographie sur papier, par électrophorèse sur papier sous haute tension, par filtration sur gel, etc.. On effectue la filtration sur gel par élution avec un tampon à pH 5,9 à l'acétate d'ammonium sur Sephadex G-25 ou CM-Sephadex, un tampon à l'acétate - pyridine à pH 4,5 sur SE-Sephadex C-50 ou avec un tampon à l'acétate - pyridi-
15 ne à pH 3,1 sur Dowex 50-X2 ou 1-X2.

Les peptides à activité tuberculique suivant la présente invention sont des solides cristallins blancs, solubles dans l'eau et ayant une masse moléculaire d'environ 500 à 1500. Les tests tuberculiques cutanés indiquent que les peptides à activité tuberculique
20 que suivant la présente invention ont des activités comparables ou supérieures à celle des DPP sur cobayes sensibilisés à l'aide d'une souche tuée par la chaleur de Mycobacterium tuberculosis de type Aoyama B ou BCG.

Les exemples non limitatifs suivants sont donnés à titre d'illustration de la préparation et de l'isolement des protéines et peptides simples, à activité tuberculique, suivant la présente invention.

Exemple 1

- On tue 100 g de corps bacillaires cultivés de Mycobacterium
30 tuberculosis de souche Aoyama B, en chauffant à 120°C pendant 30 minutes. On sépare les corps bacillaires du milieu de culture par filtration, on les désintègre aux ultra-sons et on les traite par l'acétone. On met le produit résultant à digérer avec de la ribonucléase et de la désoxyribonucléase, puis on centrifuge le mélange digéré
35 afin de séparer les protéines hydrosolubles. On dialyse les protéines hydrosolubles ainsi obtenues contre un tampon 0,001M tris(hydroxyméthyl)aminométhane-acide chlorhydrique à pH 7,0 contenant 0,0001M d'acide éthylènediamine tétracétique.

On chromatographie le dialysat résultant sur DEAE-cellulose. On effectue l'élution dans un gradient de chlorure de sodium. Virtuellement toute l'activité tuberculinique se trouve dans la seconde fraction de protéines. On chromatographie ensuite sur Sephadex G-200 dans le même tampon que précédemment, et on fractionne en trois fractions. Presque tout le produit actif se trouve dans la fraction protéinique principale. Le produit actif cristallise spontanément lorsqu'on maintient la solution à 4°C dans la solution du même tampon mélangée avec de l'acétone purifiée. A partir de 100 g de corps bacillaires, on obtient 25 mg de protéine à activité tuberculinique.

La protéine à activité tuberculinique ainsi obtenue est composée de 89 résidus d'acides aminés, et la séquence de ses acides aminés ainsi que sa composition en acides aminés par molécule sont déterminées comme suit:

15 (Séquence des acides aminés)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
H ₂ N-	Arg-Leu-Leu-Asp-Asp-Thr-Pro-Glu-Val-Lys-Val-Leu-Gly-....												
	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
...	Glu-Thr-Pro-Lys-Ala-Glu-Pro-Cys-Ile-Asp-Leu-.....												
20	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60		
...	Tyr-Ala-Glu-Val-Thr-Phe-His-Glu-Ile-Cys-Arg-.....												
	70	71	72	73	74		85	86	87	88	89		
...	Asn-Gly-Ser-Gln-Met-.....-Ala-Thr-Val-Ala-Lys-COOH												

(Asn et Gln représentent respectivement des résidus d'asparagine et de glutamine. Les autres abréviations ont les significations connues habituelles. Les résidus cystéine en position 27 et 59 forment un pont disulfure à l'intérieur de la chaîne).

(Composition en acides aminés par molécule)

Lys 4, His 1, Arg 4, Cys 2, Asp 11 (contenant un résidu d'asparagine), Thr 5, Ser 4, Glu 11 (contenant un résidu de glutamine), Pro 5, Gly 7, Ala 11, Val 8, Met 1, Ile 4, Leu 7, Try 2 et Phe 2.

Le test tuberculinique cutané montre que la protéine à activité tuberculinique ci-dessus est 100 fois plus active que DPP sur cobayes sensibilisés à l'aide d'une souche Aoyama ou BCG de Mycobacterium tuberculosis tuée par la chaleur.

Exemple 2

En suivant le procédé décrit à l'exemple 1, on prépare également à partir de BCG une protéine à activité tuberculinique composée de 135 résidus d'acides aminés.

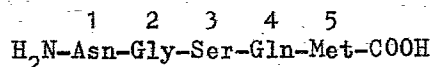
La séquence des acides aminés ainsi que la composition en acides aminés par molécule de cette protéine ont été déterminées et se sont avérées similaires à celles de la protéine à activité tuberculinique de l'exemple 1.

- 5 Le test tuberculinique cutané indique que cette protéine à activité tuberculinique a une activité à peu près égale à celle de la protéine à activité tuberculinique de l'exemple 1 sur les cobayes sensibilisés à l'aide de souches Aoyama B ou BCG de Mycobacterium tuberculosis tuées par la chaleur.

10 Exemple 3

- On soumet la protéine à activité tuberculinique obtenue à l'exemple 1 à une hydrolyse enzymatique à 37°C pendant 6 heures, dans une solution de trypsine à 1% à pH 8,4. On soumet les hydrolysats résultants à une électrophorèse bidimensionnelle sur papier sous
15 haute tension, à 75 V/cm, sur papier Whatman, dans un tampon pyridine-acétate à pH 4,5, puis on effectue une chromatographie sur papier avec un mélange butanol-acide acétique-eau (4:1:4 en volume).

- On parvient ainsi à séparer plusieurs peptides actifs. L'un d'eux est un pentapeptide présentant la séquence d'acides aminés suivante:



Un autre de ces peptides est un nonapeptide ayant une masse moléculaire de 950, environ.

- 25 Les tests tuberculiniques cutanés montrent que ces peptides à activité tuberculinique ont une activité correspondant à 1-10% de celle de la protéine tuberculinique de départ.

Exemple 4

- On hydrolyse la protéine à activité tuberculinique obtenue à l'exemple 1 dans une solution de chymotrypsine à 0,5%. On chromatogra-
30 phie les hydrolysats résultants sur colonne de Sephadex G-25 en éluant à l'aide d'un tampon à l'acétate d'ammonium à pH 5,9. On fractionne ensuite les peptides actifs ainsi obtenus, à l'aide d'un tampon pyridine-acétate à pH 3,1 sur colonne de Dowex 1-X2. Le pentapep-
35 tide à activité tuberculinique ainsi obtenu est le même qu'à l'exemple 3.

Exemple 5

On traite la protéine à activité tuberculinique de l'exemple 2 comme décrit à l'exemple 3 et on obtient également le même pentapeptide à activité tuberculinique qu'à l'exemple 3.

REVENDICATIONS

1. Protéines simples ayant une activité tuberculinique, préparées à partir de bacilles tuberculeux de type humain et de type bovin, y compris à partir de BCG, et contenant le groupe à activité tuberculinique suivant:

-Asn-Gly-Ser-Gln-Met-.

2. Protéine simple à activité tuberculinique suivant la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a une masse moléculaire comprise entre 5.000 et 25.000.

3. Protéine simple suivant la revendication 1 obtenue à partir d'une souche Aoyama B de Mycobacterium tuberculosis, caractérisée en ce qu'elle est composée de 89 résidus d'acides aminés et présente la séquence d'acides aminés et la composition en acides aminés par molécule suivantes:

séquence d'acides aminés:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
H ₂ N-Arg-Leu-Leu-Asp-Asp-Thr-Pro-Glu-Val-Lys-Val-Leu-Gly-...												
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
...-Glu-Thr-Pro-Lys-Ala-Glu-Pro-Cys-Ile-Asp-Leu-.....												
55	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60		
...-Tyr-Ala-Glu-Val-Thr-Phe-His-Glu-Ile-Cys-Arg-.....												
70	71	72	73	74			85	86	87	88	89	
...-Asn-Gly-Ser-Gln-Met-.....-Ala-Thr-Val-Ala-Lys-COOH												

Asn et Gln représentant respectivement un résidu d'asparagine et un résidu de glutamine, les autres abréviations ayant leurs significations connues habituelles, les résidus de cystéine en position 27 et 59 formant un pont disulfure intérieur à la chaîne;

composition en acides aminés par molécule:

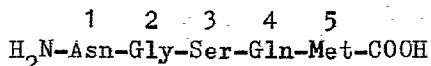
Lys 4, His 1, Arg 4, Cys 2, Asp 11 (contenant un résidu d'asparagine), Thr 5, Ser 4, Glu 11 (contenant un résidu de glutamine), Pro 5, Gly 7, Ala 11, Val 8, Met 1, Ile 4, Leu 7, Try 2 et Phe 2.

4. Peptides ayant une activité tuberculinique, préparés à partir de protéines simples ayant une activité tuberculinique suivant la revendication 1 et contenant la fraction à activité tuberculinique suivante -Asn-Gly-Ser-Gln-Met- dans laquelle les abréviations ont les significations précitées.

5. Peptide suivant la revendication 4, caractérisé en ce qu'il a une masse moléculaire comprise entre 500 et 1500.

6. Pentapeptide ayant une activité tuberculinique, suivant la

revendication 4, caractérisé par la séquence d'acides aminés :



7. Procédé de préparation de protéines simples ayant une activité tuberculinique suivant la revendication 1

caractérisé en ce que (a) on traite des corps bacillaires de bacilles tuberculeux humains ou bovins, y compris BCG, avec un solvant organique, (b) on met le produit résultant à digérer avec une nucléase, (c) on dialyse la protéine hydrosoluble obtenue contre un tampon ayant un pH de 5,5 à 7,8 qui contient de l'acide éthylènediamine tétracétique et (d) on fractionne le dialysat résultant par chromatographie et/ou filtration sur gel.

8. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce qu'on utilise des corps bacillaires de Mycobacterium tuberculosis, souche Aoyama B.

9. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce qu'on utilise des corps bacillaires de BCG.

10. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce que le solvant organique est l'acétone, le méthanol ou l'acide acétique.

11. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce qu'on dialyse la protéine hydrosoluble obtenue contre un tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane-acide chlorhydrique à pH 7,0 contenant de l'acide éthylènediamine tétracétique ou contre un tampon phosphate disodique-phosphate monopotassique à pH 7,2 contenant de l'acide éthylène diamine tétracétique.

12. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce qu'on fractionne le dialysat résultant par chromatographie sur colonne, chromatographie sur papier, électrophorèse sur papier ou filtration sur gel.

13. Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce qu'on utilise pour le fractionnement la DEAE-cellulose, l'AE-cellulose, l'ECTEOLA-cellulose ou un polymère de dextrane réticulé.

14. Procédé de préparation de peptides suivant la revendication 4, caractérisé en ce que (a) on hydrolyse la protéine à activité tuber-

culinique obtenue suivant la revendication 7 et (b) on fractionne l'hydrolysate résultant, par chromatographie et/ou filtration sur gel.

15. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce qu'on hydrolyse la protéine à activité tuberculinique à l'aide d'un
5 acide minéral ou d'une enzyme protéolytique.

16. Procédé suivant la revendication 15, caractérisé en ce que l'acide minéral est l'acide chlorhydrique.

17. Procédé suivant la revendication 15, caractérisé en ce que l'enzyme protéolytique est la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine,
10 la carboxypeptidase A ou B.

18. Procédé suivant la revendication 14, caractérisé en ce qu'on fractionne l'hydrolysate par chromatographie sur colonne, chromatographie sur papier, électrophorèse sur papier ou filtration sur gel.

15 19. Procédé suivant la revendication 18, caractérisé en ce qu'on utilise, pour le fractionnement, un polymère de dextrane réticulé.